

10/5/9511  
PCT/KR 03/01041  
RO/KR 28.05.2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

REC'D 16 JUN 2003

WIPO PCT

출원 번호 : 10-2002-0036512  
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 06월 27일  
Date of Application JUN 27, 2002

출원인 : 한국생명공학연구원  
Applicant(s) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechn

**PRIORITY  
DOCUMENT**

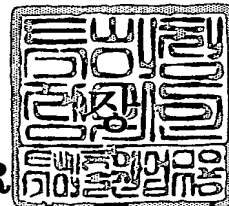
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 05 월 28 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

## 【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.06.27
【발명의 명칭】	식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법
【발명의 영문명칭】	Method for high throughput screening of plant growth regulator
【출원인】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-029927-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	곽상수
【성명의 영문표기】	KWAK, Sang Soo
【주민등록번호】	590216-1691014
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 464-1 엑스포아파트 307동 306호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이행순
【성명의 영문표기】	LEE, Haeng-Soon
【주민등록번호】	601114-2551211
【우편번호】	305-333
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 99번지 한빛아파트 126동 502호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권석윤
【성명의 영문표기】	KWON, Suk Yoon
【주민등록번호】	650808-1474011

【우편번호】	305-333
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 99번지 한빛아파트 119동 902호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김선일
【성명의 영문표기】	KIM,Sun-Il
【주민등록번호】	770101-1405116
【우편번호】	301-758
【주소】	대전광역시 중구 오류동 삼성아파트 22동 805호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김창진
【성명의 영문표기】	KIM,Chang-Jin
【주민등록번호】	550828-1067921
【우편번호】	305-504
【주소】	대전광역시 유성구 구룡동 391번지 타운하우스 7동 203호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이향범
【성명의 영문표기】	LEE,Hyang-Burm
【주민등록번호】	630518-1464321
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동99번지 한빛아파트 126동 803호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상한
【성명의 영문표기】	LEE,Sang-Han
【주민등록번호】	600923-1675721
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 383-2 과기원아파트 2동 505호
【국적】	KR

**【발명자】****【성명의 국문표기】**

최선미

**【성명의 영문표기】**

CHOI, Sun-Mee

**【주민등록번호】**

770203-2110417

**【우편번호】**

302-170

**【주소】**

대전광역시 서구 갈마동 1007번지 경호주택 203호

**【국적】**

KR

**【심사청구】**

청구

**【취지】**

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)

**【수수료】****【기본출원료】**

20 면 29,000 원

**【가산출원료】**

12 면 12,000 원

**【우선권주장료】**

0 건 0 원

**【심사청구료】**

7 항 333,000 원

**【합계】**

374,000 원

**【감면사유】**

정부출연연구기관

**【감면후 수수료】**

187,000 원

**【첨부서류】**

1. 요약서·명세서(도면)\_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 녹색배양세포에 식물생장조절물질 후보군을 첨가하고 배양한 후 세포의 성장을 동시에 대규모로 측정하는 식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용하면 적은 시료로 많은 수의 시료를 간편하고, 신속하게 스크리닝할 수 있을 뿐만 아니라 식물생장조절물질의 생체내 활성화도 평가할 수 있기 때문에 식물에 대한 생장저해 및 생장촉진 물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.

**【대표도】**

도 2

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법{Method for high throughput screening of plant growth regulator}

## 【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 사용한 우산이끼 녹색배양세포, 담배 녹색배양세포, 벼 비녹색배양세포를 나타낸 것이다. A는 페트리디쉬에서 배양되고 있는 캘러스를 나타낸 것이고, B는 삼각 플라스크에서 배양되고 있는 현탁배양세포를 나타낸 것이다. 우산이끼 녹색배양세포, 담배 녹색배양세포 및 벼 비녹색배양세포의 g 세포 생중량 당 클로로필 함량( $\mu\text{g/g cell fresh wt}$ )은 각각 12.3, 11.5, 0.15이다.

도 2는 96 마이크로웰(96 micro-well) 플레이트에서 배양세포를 배양하여 식물생장조절물질(약제)을 스크리닝하는 사진이다. A는 계대배양 직후 배양세포에 약제를 처리하기 전의 모습이고, B는 약제처리 후 7일째의 모습이고, C는 약제처리 후 7일째 세포에 TTC를 처리한 후 5시간째의 모습이다. 화살표로 표시된 웰은 화합물에 의해 저해가 된 모습이다.

도 3은 TTC 반응 후 세포생존을 분석한 사진이다. 광합성억제 제초제인 아트라진(atrazine)을 농도별(최종농도 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30  $\mu\text{M}$ )로 처리 후 7일째에 TTC를 처리하고 배지를 제거한 후 웰에 남아 있는 세포에 95% 에탄올을 첨가하여 60℃에서 5시간 반응시켰다. TTC 반응 후 세포 내에 형성된 포르마잔(formazan)의 양과 배지로

빠져 나온 포르마잔의 양을 490 nm에서 분석하여 서로 비교한 결과이다. 두 시스템은 잘 일치함을 알 수 있다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<4> 본 발명은 식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 녹색배양세포에 식물생장조절물질 후보군을 첨가하고 배양한 후 세포의 생장을 동시에 대규모로 측정하는 식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법에 관한 것이다.

<5> 제초제를 포함한 식물생장조절제(plant growth regulator, PGR)의 개발을 위한 약제의 1차 효능평가는 온실에서 어린 식물체를 대상으로 하여 약제가 식물체의 생장에 미치는 영향을 조사하는 것이 일반적이다. 상기와 같은 방법은 식물체에 대한 직접적인 생장저해 등을 평가할 수 있는 장점이 있으나, 효능평가 초기단계에서 많은 양의 약제가 필요할 뿐만 아니라 효능평가를 하는데 많은 시간과 비용이 요구되는 단점이 있다.

<6> 한편 의약품의 개발은 인체 세포주를 대상으로 시험관내(

*in vitro*)에서 약제의 활성(세포독성)을 조사한 후, 활성이 있는 화합물을 대상으로 실험동물을 사용하여 화합물의 독성 및 효능을 조사하여, 독성이 없고 활성이 우수한 후보물질을 대상으로 최종적으로 임상실험을 실시하는 것이 일반적이다(Skehan 등, 82: 1107, 1990). 따라서 제초제를 포함한 식물생장조절물질의 효능평가도 의약품 개발처럼 시험관내에서 활성평가를 일차적으로 실시한다. 식물에서 분리한 무세포계(cell-free system)를 이용하여 제초제의 시험관내 일차검정이 수행되기도 하였으나, 이는 식물체를 이용한 생체내 결과와 상관성이 없거나 또는 상관성이 매우 낮아 실용적인 방법으로 이용되지 못하고 있는 실정이다. 예를 들어 광합성 전자전달계(photosynthetic electron transport, PET)를 억제하는 화합물의 경우, 틸라코이드막(thylakoid membrane)을 이용한 힐(Hill) 반응에서는 높은 활성을 지닌 화합물이라도 잡초에 대한 제초활성이 거의 없는 경우가 많다(Asami 등, *Agric Biol Chem* 51: 205-210, 1987; Sato 등, *Z Naturforsch* 26c: 563-568, 1991).

<7> 식물세포 배양기술은 재조합 DNA를 이용한 형질전환 식물체의 개발, 체세포배양 등을 이용한 유용식물의 대량번식, 세포배양을 통한 유용물질의 대량생산 등 식물생명공학 분야의 핵심 기반기술이다. 식물배양세포는 비교적 균일한 세포집단이며, 투여한 물질의 흡수가 용이하고 배양환경을 자유롭게 정확하게 제어할 수 있는 점과 적은 시료와 비용으로 약제의 효능을 측정할 수 있는 등 많은 장점이 있다. 그러나 대부분의 식물배양세포는 엽록체의 분화 및 발달이 거의 없어 외부로부터 공급되는 탄소원에 의존하여 자라는 특징이 있다. 현재 사용되고 있는 제초제의 과반수 이상이 광합성 전자전달계를 포함한 엽록체에 작용하고 있어, 식물배



양세포계를 이용하여 제초제의 활성을 검색하기 위해서는 엽록체가 분화된 녹색배양세포를 사용할 필요가 있다(Dalton, *Biochem Soc Trans* 8: 475-477, 1980; Nishida 등, 21: 47-55, 1980; Sato 등, *Plant Cell Rep* 6: 401-404, 1987). 녹색배양세포를 이용하여 세포무게 측정, 산소전극(oxygen electrode)을 이용한 산소발생, 이온전도도계를 이용한 배지의 이온전도도(ion conductivity) 등을 측정하여 제초활성을 조사할 수 있음이 보고된 바 있다(Sato 등, *Z Naturforsch* 26c: 563-568, 1991; Kwon 등, *Kor J Plant Tissue Cult* 26: 183-187, 1999). 그러나 상기 세포무게 측정, 산소발생 및 이온전도도의 측정은 모두 수작업으로 이루어지기 때문에 실험의 자동화가 어려웠고, 측정방법의 한계 등으로 인하여 실험규모의 축소가 어려운 점 등으로 인하여 실용적으로 이용되지 않는 실정이다

<8> 이에 본 발명자들은 엽록체가 분화된 녹색배양세포를 사용하여 마이크로웰 플레이트에 화합물(합성화합물, 천연화합물) 또는 천연추출물(식물추출물, 미생물배양액 등) 등과 함께 일정기간 배양한 후, 세포의 생존능력(viability)을 확인하는데 사용하는 시약 등을 첨가하여 배양세포의 생장에 미치는 영향을 고효율 스크리닝 판독기 등으로 자동적으로 측정함으로써, 매우 적은 양의 시료로 많은 수의 화합물 또는 추출물을 동시에 신속하게 식물체의 활성을 효율적으로 반영하는 식물생장조절물질의 새로운 스크리닝 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

**【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】**

<9> 본 발명의 목적은 식물생장조절물질을 스크리닝하는데 있어서 매우 적은 양의 시료로 많은 수의 시료를 신속하게 스크리닝하고, 생체내에서의 활성을 반영할 수 있게 녹색배양세포를 이용하여 식물생장조절물질을 동시에 대규모로 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

**【발명의 구성 및 작용】**

<10> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 녹색배양세포를 이용한 식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법을 제공한다.

<11> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<12> 본 발명은 녹색배양세포에 식물생장조절물질 후보군을 첨가하고 배양한 후 세포의 성장을 동시에 대규모로 측정하는 식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법을 제공한다

<13> 시험관내에서 식물체에 대한 활성을 반영하면서 적은 양의 시료를 가지고 많은 수의 시료를 동시에 효율적으로 평가하기 위해서는 1) 식물체에서 활성을 반영할 수 있는 적절한 배양세포 시스템, 2) 적은 규모에서 평가할 수 있는 배양 시스템, 3) 간단한 처리에 의해 정량적으로 평가할 수 있는 시스템, 및 4) 자동화가 가능한 평가시스템의 구축이 요구된다. 본 발명에서는 상기 조건들을 모두 만족시킬 수 있는 스크리닝 방법을 제공한다.

<14> 본 발명에서는 식물생장조절물질이 식물체에 미치는 활성을 반영할 수 있는 적절한 배양세포 시스템으로 녹색배양세포를 사용하였다. 녹색배양세포는 아마란투스 크루엔투스(*Amaranthus cruentus*), 아스파라구스 오피시날리스(*Asparagus officinalis*), 체노포디움 루브럼(*Chenopodium rubrum*), 시티서르 스포파리우스(*Cytisus scoparius*), 다투라이녹시아(*Datura innoxia*), 디지털리스 퍼퍼리(*Digitalis purpurea*), 폴리신 맥스(*Glycine max*), 고시피움 허수툼(*Gossypium hirsutum*), 히오시아무스 나이거(*Hyoscyamus niger*), 니코티아나 타바쿰(*Nicotiana tabacum*; 담배), 마타티아 폴리모파(*Marchantia polymorpha*; 우산이끼) 스피나티아 오레라시(*Spinachia oleracea*) 및 솔라눔 투버로숨(*Solanum tuberosum*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있으며(식물조직배양 3: 147-155. 1986), 우산이끼 녹색배양세포 또는 담배 녹색배양세포를 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명의 녹색배양세포는 고등식물과 같은 엽록체 구조를 하고 있으면서 성장속도가 매우 빠르며, 세포가 매우 균일하기 때문에 마이크로웰 규모의 적은 규모의 배양에도 일정한 농도로 세포를 접종하고 배양할 수 있다.

<15> 식물배양세포는 비교적 균일한 세포집단이며, 투여한 물질의 흡수가 용이하고 배양 환경을 자유롭고 정확하게 제어할 수 있는 점과 적은 양의 시료와 비용으로 약제의 효능을 측정할 수 있는 등의 장점이 있다. 그러나 대부분의 식물배양세포는 엽록체의 분화가 거의 발달되지 않아 외부로부터 공급되는 탄소원에 의존하여 자라는 종속영양을 하는 특징이 있다. 본 발명에서는 엽록체가 잘 분화되어 있고, 세포가 매우 균일하며 잘 자라는 특징이 있는 우산이끼(*Marchantia polymorpha* L.) 녹색배양세포(Ohta 등, Planta

136: 229-232, 1977)와 담배(*Nicotiana tabacum* cv. BY4) 녹색배양세포(Cha 등, Korean J Bot 36: 113-120, 1993)를 사용하였다.

<16> 본 명세서에 기재된 녹색배양세포는 광혼용영양배양세포(photomixotrophic cultured cell, PM 세포)를 지칭하며, 광혼용영양배양세포는 엽록체가 분화되어 있으나 외부에서 탄소원을 공급하면 잘 자라는 식물배양세포이다. 식물배양세포로는 상기 광혼용영양배양세포 외에도 엽록체가 분화되어 있지 않은 종속영양배양세포 또는 엽록체가 분화되어 있으며 외부에서 탄소원을 공급하지 않아도 자랄 수 있는 광독립영양배양세포가 있으나, 상기 종속영양배양세포는 엽록체가 분화되어 있지 않고, 광독립영양배양세포는 생장이 매우 느리기 때문에 본 발명의 대규모 스크리닝에는 적합하지 않다.

<17> 본 발명에서는 적은 양의 시료를 가지고 많은 수의 시료를 동시에 스크리닝하기 위하여 마이크로웰 플레이트에 녹색배양세포 및 식물성장조절물질 후보군을 첨가하여 배양하고, 세포의 생장을 측정하였다. 마이크로웰 플레이트는 일반적으로 세포의 배양에 사용되는 모든 마이크로웰 플레이트를 사용할 수 있고, 24 마이크로웰 플레이트, 96 마이크로웰 플레이트, 386 마이크로웰 플레이트, 960 마이크로웰 플레이트 및 9600 마이크로웰 플레이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 사용하는 것이 바람직하다.

<18> 현재는 나노기술(nano-technology) 시대로, 화합물의 1차 스크리닝에도 적은

양의 시료를 사용하여도 평가가 가능하여야 한다. 즉 제초제를 포함한 식물생장조절물질의 효능 평가도 의약품 개발처럼 시험관내에서 활성평가를 일차적으로 실시한 후, 활성이 있는 화합물을 대상으로 식물체를 사용한 생체내 실험을 하는 것이 합리적이다.

본 발명에서는 식물배양세포를 마이크로웰 플레이트를 사용하여 웰당 10 내지 1000  $\mu\text{l}$ 의 배지를 첨가한 배양규모에서 배양세포를 효율적으로 배양이 가능하였으며 이때 미량의 약제만 있어도 수회 반복실험이 가능하였다. 1차 스크리닝에서 1 ppm 수준에서 활성이 있어야 2차 스크리닝에 진입할 필요가 있다는 점을 고려한다면 본 발명의 마이크로웰 플레이트를 이용한 배양규모는 매우 이상적인 것으로 판단된다.

<19> 또한, 본 발명에서는 식물생장조절물질 후보군으로 가능한 모든 물질을 사용하여 스크리닝할 수 있고, 합성화합물, 천연물을 포함한 순수화합물, 식물추출물 및 미생물 배양액을 포함하는 추출물 또는 분획으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있다. 식물배양세포에 식물생장조절물질 후보군의 처리는 각각의 다른 물질을 동시에 처리할 수도 있고, 하나의 물질을 각각 다른 농도로 처리할 수도 있으며, 각각의 다른 물질을 여러 가지 농도로 동시에 처리할 수도 있다. 이는 하나의 마이크로웰 플레이트 내에서 단 한번의 스크리닝을 통하여 여러 가지 물질 및 여러 가지 농도로 식물생장조절물질 후보군이 식물생장조절에 미치는 영향을 측정함으로써, 개별적으로 스크리닝하거나 각각의 실험에서 생길 수 있는 오차를 없앨 수 있어 정확한 스크리닝이 가능하다.

<20> 또한, 본 발명에서는 간단한 처리에 의해 정량적으로 평가하는 시스템으로, 녹색배양세포에 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드(2,3,5-triphenyltetrazolium

chlorolide; 이하 "TTC"라 약칭한다)를 첨가한 후 OD 값을 측정하여 세포의 성장을 측정하였다.

<21>     마이크로웰과 같이 적은 규모의 배양(웰당 150  $\mu$ l의 배양규모)에서는 초기 세포 접종량이 생중량으로  $\mu$ g 이하이므로 약제처리 후 일정기간 배양 후 배양세포의 무게를 측정하거나, 배지의 이온농도를 측정하기가 쉽지 않다. 따라서 본 발명에서는 약제에 의한 세포생장에 미치는 영향은 세포의 생존능력을 평가하는데 사용하고 있는 화합물이면서 화합물의 반응이 발색반응으로 세포의 피해정도를 정량화하기 쉬운 물질로 TTC 화합물을 사용하여 측정하였다. TTC 화합물은 살아 있는 미토콘드리아 내막(mitochondrial inner membrane)의 효소와 반응(TTC의 환원반응)하여 적색(deep red)의 포르마잔(formazan)으로 변환된다(Lakon, Ber Dtsch Bot Ges 60: 299, 1942). 따라서 약제처리에 피해를 입지 않은 세포는 TTC 반응으로 적색을 나타내지만, 약제에 피해를 입은 세포는 무색을 띄게 된다. 따라서 포르마잔의 흡수파장인 490 nm 전후에서 OD 값을 측정함으로써 간단하게 약제의 효능을 평가할 수 있다. 또한 약제를 처리하지 않은 무처리 세포보다 높은 OD 값을 나타내는 처리구의 경우는 식물세포의 성장을 촉진하는 화합물이 될 수 있다. 따라서 본 발명의 스크리닝 방법은 식물생장억제활성을 갖는 물질 뿐만 아니라 식물생장촉진활성을 갖는 물질을 스크리닝하는 목적에도 유용하게 이용될 수 있다.

<22>     많은 종류의 화합물의 활성을 단시간에 정량적으로 평가하기 위해서는 자동화 시스템이 요구된다. 본 발명에서는 TTC 반응에서 나타내는 발색반응산물의 흡수파장을 측정하는 방법을 도입하여 반응액을 고효율 스크리닝(HTS) 판독기를 사용하여 많은 시료를 효율적으로 단시간에 정량화할 수 있다. 종래에 세포의 생존능력을 확인할 경우에는 세

포에 용매를 첨가한 후 세포를 분쇄하고 원심분리 후 흡광도를 측정한다. 그러나 상기와 같은 기존의 방법은 다량의 시료를 정량적으로 측정하는데 어려움이 있다. 따라서 본 발명에서는 약제를 첨가한 후 배양을 종료한 후, 일단 멀티피펫으로 배지를 제거하고 일정 양의 에탄올 등을 첨가하여 일정기간 반응시키면 TTC 반응에서 생성된 포르마잔이 세포 밖으로 유리된다는 것을 이용하면 세포를 분쇄하는 번거로움 없이 효율적으로 약제의 효능을 평가할 수 있다(도 2 참조).

- <23> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드를 사용하여 세포의 성장을 측정하여 식물생장조절물질을 스크리닝하였다. 구체적인 식물생장조절물질의 스크리닝 방법은,
- <24> 1) 마이크로웰 플레이트에 녹색배양세포 및 식물생장조절물질 후보군을 첨가하여 배양하는 단계;
- <25> 2) 상기 배양 후에 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드로 처리하는 단계;
- <26> 3) 상기 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드 처리한 후 마이크로웰 내의 용액을 제거하는 단계;
- <27> 4) 상기 마이크로웰에 에탄올을 첨가하여 반응시키는 단계;
- <28> 5) 상기 반응용액을 새로운 마이크로웰 플레이트에 옮기는 단계; 및
- <29> 6) 상기 마이크로웰 플레이트를 고효율 스크리닝 판독기를 이용하여 OD 값을 측정하는 단계를 포함한다.

- <30>      상기 단계 3)에서는 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로라이드 처리 후 3 내지 7시간 후에 마이크로웰 내의 용액을 제거하는 것이 바람직하고, 4.5 내지 5.5 시간 후가 더욱 바람직하고, 5시간 후가 가장 바람직하다. 또한, 상기 단계 4)에서는 10 내지 100% 에탄올을 첨가하는 것이 바람직하고, 85 내지 100% 에탄올을 첨가하는 것이 더욱 바람직하고, 95% 에탄올을 첨가하는 것이 가장 바람직하다. 또한, 에탄올 첨가후에 50 내지 70℃에서 0.1 내지 3 시간 반응시키는 것이 바람직하고, 55 내지 65℃에서 0.5 내지 2시간 반응시키는 것이 더욱 바람직하고, 60℃에서 1 시간 반응시키는 것이 가장 바람직하다.
- <31>      본 발명의 바람직한 실시예에서, 식물생장조절물질 후보군으로 제초제를 사용하여 녹색배양세포 또는 비녹색배양세포(종속배양세포)에 미치는 영향을 조사한 결과, 엽록체 분화가 발달된 녹색배양세포가 엽록체가 분화되지 않은 종속배양세포보다 식물체에 대한 제초활성을 잘 반영하는 것으로 나타났고, 녹색배양세포를 사용한 경우에는 합성 화합물 또는 천연화합물을 낮은 농도로 처리하였을 때에도 식물체에 미치는 활성을 잘 반영하였다(표 2 및 표 3 참조). 또한, 본 발명의 스크리닝 시스템은 화합물 뿐만 아니라 식물 추출물 또는 미생물 배양액을 대상으로 식물생장조절물질을 스크리닝하거나 활성물질을 분리하는 정제과정에 이용할 수도 있다(표 4 및 표 5 참조).
- <32>      이상과 같이 본 발명에서는 녹색배양세포를 이용하여 시험관내에서 식물체에 대한 활성을 반영하면서 적은 양의 시료를 가지고 많은 수의 시료를 단시간에 효율적으로 평가하기 위해 필요한 조건을 만족하는 시스템을 확립하였다. 본 발명의 스크리닝 방법을



이용하면 제초제를 포함한 식물생장조절물질을 개발하는데 필요한 비용과 시간을 획기적으로 줄일 수 있다.

<33> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<34> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<35> <실시예 1> 엽록체가 분화된 우산이끼 및 담배 녹색배양세포의 배양

<36> 우산이끼(*Marchantia polymorpha* L.) 녹색배양세포는 Ohta 등(*Planta*, 136: 229-232, 1977)이 개발한 것을 사용하였다. 배지는 비타민 류와 대량원소는 M51 배지(Furner 등, *Plant Sci Lett* 11: 169-176, 1978), 카스아미노산(casamino acid), 글루타민(glutamine)과 2,4-D를 포함한 미량원소는 B5배지(Gamborg 등, *Exp Cell Res* 50: 151-158, 1968)를 이용하였으며 첨가한 농도는 표 1에 정리하였다.

<37> 【표 1】

우산이끼 녹색배양세포 배양에 사용된 배지조성

다량영양소 (Macronutrients) (/L)		미량영양소 (Micronutrients) (/L)		비타민 (/L)		기 타	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400 mg	KI	0.75 mg	미오-이노시톨	100mg	카스아미노산	1g
KNO <sub>3</sub>	2 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 mg	티아민-HCl	10mg	L-글루타민	200mg
CaCl <sub>2</sub>	300 mg	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg	니코틴산	1mg	2,4-D	1mg
KH <sub>4</sub> PO <sub>2</sub>	275 mg	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 mg	괴리독신-HCl	1mg	수크로스	20g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 mg	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025 mg				
		CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025 mg	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.9mg		
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 mg	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3mg		

- <38> 우산이끼 현탁배양세포는 250 ml 플라스크에 상기조성의 액체배지 50 ml과 세포 생중량 0.5 g을 접종하여 25℃의 광조건(약  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )에서 100 rpm으로 현탁배양하였다(도 1). 세포의 계대배양은 9일 간격으로 하였다.
- <39> 계대배양 후 2~3일째 세포 3 g을 액체배지 200 ml에 현탁하여 일정한 농도의 세포를 96 마이크로웰 플레이트에 웰당 150  $\mu\text{l}$ 를 분주하였다(최종농도는 약 0.2  $\mu\text{g}$  생체중/150  $\mu\text{l}$ )(도 2의 A). 세포를 일정하게 접종한 후 화합물 또는 추출물을 첨가하여 1주일간 배양하여 세포의 생장억제 또는 생장촉진 등을 하기 실시예 2와 같은 방법으로 활성을 평가하였다.
- <40> 담배(*Nicotiana tabacum* cv. BY4) 녹색배양세포는 Cha 등(*Korean J Bot* 36: 113-120, 1993)이 NaCl 저항성세포로 개발한 것을 이용하였다(도 1). 사용한 배지는 2,4-D 0.7 mg/L와 키네티(kinetin) 0.03 mg/L가 첨가된 MS 기본배지였다. 담배 현탁배양세포는 250 ml 플라스크에 액체배지 50 ml과 세포생중량 2 g을 접종하여 25℃ 광조건(약  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )에서 100 rpm으로 현탁배양하였다. 세포의 계대배양은 14일 간격으로 하였다.
- <41> 계대배양 후 2~3일째 세포 3 g을 액체배지 200 ml에 현탁하여 일정한 농도의 세포를 96 마이크로웰 플레이트에 웰당 150  $\mu\text{l}$ 를 분주하였다(최종농도는 약 0.2  $\mu\text{g}$  생체중/150  $\mu\text{l}$ ). 세포를 일정하게 접종한 후 화합물 또는 추출물을 첨가하여 1주일간 배양하여 세포의 생장억제 또는 생장촉진 등을 실시예 2와 같은 방법으로 활성을 평가하였다.

<42> <실시예 2> 마이크로웰에서 세포배양 및 TTC 처리에 의한 화합물의 효능평가

<43> 본 발명에 사용하는 모든 화합물과 추출물은 아세톤(acetone), N,N-디에틸포름아미드(N,N-dimethylformamide; 이하 "DMF"라 약칭한다) 등에 용해시킨 후 일종농도가 되도록 세포배양 시작과 동시에 각 웰에 1.5  $\mu$ l를 무균적으로 처리하였다. 각 화합물을 녹인 유기용매의 최종농도는 1%(1.5  $\mu$ l/150  $\mu$ l)로 하였다. 모든 실험에는 광합성 억제제 초제인 아트라진(atrazine)을 대조구로 처리하였다.

<44> 배양 후 7일째 세포의 생존능력(viability)을 조사하기 위하여 2,3,5-트리페닐 테트라졸리움 클로라이드(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride; 이하 "TTC"라 약칭함)를 12 mM로 처리하였다. TTC 화합물은 살아 있는 미토콘드리아 내막(mitochondrial inner membrane)의 효소와 반응(TTC의 환원반응)하여 적색(deep red)의 포르마잔(formazan)으로 변환된다(Lakon, *Ber Dtsch Bot Ges* 60: 299, 1942). 따라서 약제처리에 피해를 입지 않은 세포는 TTC 반응으로 적색을 나타내지만, 약제에 피해를 입은 세포는 무색을 띄게 된다.

<45> 상기 세포의 생존능력 조사를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 1) TTC 용액(150  $\mu$ l)을 각 웰에 처리한다. 2) TTC 처리 후 반응 5시간째에 8 채널의 멀티피펫(multi-pipette)으로 웰 내의 용액을 제거한다. 3) 각 웰에 95% 에탄올 150  $\mu$ l을 첨가하여 60°C에서 1시간 반응시킨다. 4) 반응 후 반응용액만을 새로운 96웰로 옮긴다. 5) 상기 웰을 고효율 스크리닝(high throughput screening; HTS) 판독기로 신속하게 490 nm 파장에서 OD 값을 분석한다.

<46> 이러한 조건에서는 TTC 반응으로 세포 내에 형성된 포르마잔(formazan)의 양과 배지로 빠져 나온 포르마잔의 양은 거의 일치함을 알 수 있다(도 3). 상기 단계 2)에서 TTC 용액처리 후 1시간 반응에는 충분한 양의 포르마진이 세포 밖으로 유리되지 않았으나, 5시간 반응에는 약 50%가 유리되어 나와 세포 내와 세포 밖의 포르마진의 양은 거의 같았다. 따라서 모든 실험은 세포 내의 포르마잔의 양을 직접 정량하는 번거로움을 피하고 에탄올을 전처리하여 5시간째 세포 밖으로 유리되는 포르마진의 양을 측정함으로써 다량의 약제의 효능을 간편하면서 신속하게 평가할 수 있다. 대조구로 사용한 아트라진이 세포생장의 50%를 저해하는 농도는 약  $0.68 \mu\text{M}$  (0.18 ppm)이었다. 이 농도는 플라스크에서 실험하였을 때 세포생장 저해활성과 거의 같은 값으로 TTC 반응에 의한 화합물의 저해활성은 세포생장 저해를 잘 반영하였다.

<47> <실시예 3> 합성 순수화합물의 효능평가

<48> 작용기작이 다른 제초제 13종을 사용하여 실시예 1의 배양방법과 실시예 2의 효능평가법에 따라 우산이끼 녹색배양세포, 담배 녹색배양세포 및 벼 비녹색배양(종속배양) 세포에 미치는 이들 화합물의 영향을 조사하였다. 벼는 정 등(*Korean J Plant Tissue Culture* 18: 209-214, 1991)이 미성숙 배에서 개발한 것을 사용하였다. 그 결과 시판 제초제가 배양세포에 미치는 영향은 다양하였으나, 엽록체 분화가 발달된 녹색배양세포가 엽록체가 분화되지 않은 종속배양세포보다 식물체에 대한 제초활성을 잘 반영하였다(표 2).

## &lt;49&gt; 【표 2】

기존 합성제초제의 우산이끼 녹색배양세포, 담배 녹색배양세포 및 벼 비녹색배양세포 (중속배양세포)에 대한 활성 (IC<sub>50</sub>: ppm) 비교

제초제명	우산이끼 녹색배양세포	담배 (BY4) 녹색배양세포	벼 (태백벼) 비녹색배양세포	작용기작 (저해부위)
아트라진	0.21	0.18	>10	PSII (광합성전자전달계)
리누론	0.244	>10	7.07	PSII (광합성전자전달계)
프로파닐	0.037	5.83	8.49	PSII (광합성전자전달계)
클로로메톡시닐	0.076	0.193	>10	Protox (Chlorophyll 생합성)
옥사디아존	0.03	0.39	6.88	Protox (Chlorophyll 생합성)
디플루페니칸	0.031	4.67	>10	카로테노이드 생합성
디티오피르	0.048	0.141	0.613	Lipid 생합성
페녹사프로-P-에틸	0.70	4.58	6.47	ACCase 생합성
이마자피르	0.35	0.018	0.269	ALS 생합성
LGC-42153	0.0011	0.0022	1.793	ALS 생합성
프라졸설푸론-에틸	0.0012	0.001	0.066	ALS 생합성
피리벤족심	0.0092	0.0026	7.83	ALS 생합성
나프로아닐리드	0.054	0.0019	6.69	호르몬생합성

PSII: 포토신테틱 II(photosynthetic II)

Protox: 프로토포피린 IX(protoporphyrin IX)

ACC: 1-아미노사이클로프로판-1-카복실산 신타제(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase)

ALS: 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase)

<50> 적은 양으로 높은 제초활성을 나타내는 아세토락테이트 신타제(acetolactate synthase; ALS) 저해활성을 지닌 프라졸설푸론-에틸(prazosulfuron-ethyl)과 피리벤족심(pyribenzoxim) 제초제들이 녹색배양세포에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 광합성 전자전달계(PSII)를 저해하는 제초제인 아트라진, 리누론(linurone)과 프로파닐(propanil), 클로로필(chlorophyll) 생합성 중간체인 프로토포피린 IX(protoporphyrin IX; protox)의 생합성을 억제하는 클로로메톡시닐 (chloromethoxynil)과 옥사디아존(oxadiazon), 카로테노이드(carotenoid) 생합성 저해제초제인 디플루페니칸

(diflufenican) 등과 같이 작용점이 엽록체인 제초제는 녹색배양세포에 강한 저해활성을 나타내어 식물체의 활성을 잘 반영하였다. 반면 엽록체에 저해작용을 하는 제초제는 비녹색 배양세포(종속영양 배양세포)의 경우 낮은 활성을 나타내거나 10 ppm에서도 저해활성을 나타내지 않은 아트라진, 클로로메톡시닐(chloromethoxynil), 디플루페니칸(diflufenican) 제초제도 있었다. 따라서 녹색배양세포를 이용하여 96 웰에서 화합물을 첨가하여 배양한 후, TTC반응에서 생성되는 포르마잔을 HTS 판독기로 간접적으로 측정하는 방법은 제초활성을 반영하는 매우 유용한 검정법으로 확인되었다.

#### <51> <실시에 4> 천연 화합물의 효능평가

<52> 다양한 식물체에서 분리되어 보고된 천연 화합물을 사용하여 우산이끼 녹색배양세포에 대한 활성을 실시예 1의 배양방법과 실시예 2의 효능평가법에 따라 조사하여 수생 식물인 잠개구리밥(*Lemna paucicostata*)에 대한 활성과 비교하였다. 우산이끼 녹색배양세포의 경우는 최종농도가 1 ppm인 결과이고, 잠개구리밥의 경우는 31 ppm의 결과이다.

<53> 잠개구리밥을 이용한 저해활성은 화합물을 농도별로 희석하여 잠개구리밥이 허트너 영양배지(Hutner's nutrient medium)에서 자라는 24 웰 플레이트에 치상하여 5일 후 생육저해여부를 조사하였다. 활성저해 평가는 육안판별로 0에서 5까지 6등급으로 구분하였다. 0은 10% 이하의 저해활성, 1은 11~30%의 저해활성, 2는 31~50%의 저해활성, 3은 51~70%의 저해활성, 4는 71~90%의 저해활성, 5는 91~100%의 저해활성을 나타내는 것으로 정의하였다.

<54> 표 3은 여러 가지 화합물의 결과로서 우산이끼의 값(% 저해활성)은 1- (화합물처리  
의 OD/대조구의 OD) X 100으로 계산하였다. 여기서 + 값은 세포생장 저해활성을 나타내  
는 것이고, - 값은 세포생장을 촉진하는 것을 의미한다. 사용한 16개 화합물은 우산이  
끼 배양세포에 다양한 저해활성을 나타내었으며, 벤조산(benzoic acid) 등 13개 화합물  
에서 저해활성을 나타내었으며, 코우마린(coumarine)이 33% 저해활성을 나타내었다. 대  
부분의 화합물에서 수생식물인 잠개구리밥의 활성과 비례하였다. 홍미롭게도 페룰린산  
(ferulic acid), 디쿠마롤(dicumarol), 3-코우마라논(3-coumaranone)은 세포생장을 촉진  
하여 식물생장촉진효과가 있었다. 따라서 우산이끼 녹색배양세포는 천연물화합물을 낮  
은 농도로 처리하였을 때에도 식물체의 활성을 반영하므로 본 발명에서 개발한 생물검정  
법은 매우 유용함을 확인할 수 있었다.

<55> 【표 3】

식물체에서 분리한 16개 화합물의 우산이끼 녹색배양세포와 잠개구리밥에 대한 활성

화합물	우산이끼 배양세포* (% 활성, 1 ppm)	잠개구리밥 (Lemna) (% 활성, 31 ppm)
벤조산(Benzoic acid)	9	10
카페인산(Caffeic acid)	21	30
코우마린(Coumarin)	33	80
디쿠마롤(Dicumarol)	-31	30
o-코우마린산(o-Coumaric acid)	32	30
p-코우마린산(p-Coumaric acid)	17	30
3-코우마라논(3-Coumaranone)	-18	0
페룰산(ferulic acid)	-35	20
갈산(Gallic acid)	8	0
젠티스틴산(Gentistic acid)	9	0
하이드로퀴논(hydroquinone)	15	0
프로토크테추산 에틸 에스테르 (Protocatechuic acid ethyl ester)	22	70
스코포레틴(Scopoletin)	16	0
시린지산(Syringic acid)	16	0
쑤벨리페론(Umbelliferone)	6	40
바닐산(Vanillic acid)	10	10

<56> \*우산이끼의 %활성 =  $[1 - (\text{화합물처리의 OD} / \text{대조구의 OD})] \times 100$  이며,

<57> + 값은 세포생장 저해활성을, - 값은 세포생장 촉진활성을 나타냄

<58> <실시예 5> 식물추출물(분획)의 효능평가

<59> 자생식물이용기술개발사업단내 한국식물추출물은행에서 분양받은 가막살나무(*Viburnum dilatatum*) 열매를 포함한 50종의 메탄을 추출물(최종농도 10 ppm)을 사용하여 실시예 1의 배양방법과 실시예 2의 효능 평가법에 따라 우산이끼 녹색배양세포에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 식물추출물은 다양한 활성을 나타내었는데, 굴거리(*Daphniphyllum macropodum*) 작은가지, 까마귀밥나무(*Ribes fasciculatum* var. *chinese*) 열매, 넓은잎쥐오줌풀(*Valeriana officinalis* var. *latifolia*) 잎과 줄기/뿌리, 노랑하늘타리(*Trichosanthes kinilowii* var. *japonica*) 종자의 추출물은 50% 이상을 저해활성을 나타내었다(표 4).



&lt;60&gt; 【표 4】

식물 추출물 50종이 우산이끼 녹색배양세포 성장에 미치는 영향

식물명 (학명)	부위	TTC반응후 OD값	저해활성 (%)
무처리 (control)			
가막실나무 ( <i>Viburnum dilatatum</i> )	열매	0.808	0
감탕나무 ( <i>Ilex integra</i> )	잎	0.536	34
감탕나무 ( <i>Ilex integra</i> )	잎	0.735	9
감탕나무 ( <i>Ilex integra</i> )	줄기-심재	0.680	16
감탕나무 ( <i>Ilex integra</i> )	줄기-수피	0.636	21
개가지나무 ( <i>Quercus gilva</i> )	잎	0.756	6
개가지나무 ( <i>Quercus gilva</i> )	줄기-심재	0.735	9
개가지나무 ( <i>Quercus gilva</i> )	줄기-수피	0.841	0
거지덩굴 ( <i>Cayratia japonica</i> )	잎	0.802	1
거지덩굴 ( <i>Cayratia japonica</i> )	열매	0.623	23
검팽나무 ( <i>Celtis choseniana</i> )	잎	0.560	31
검팽나무 ( <i>Celtis choseniana</i> )	줄기	0.570	29
검팽나무 ( <i>Celtis choseniana</i> )	열매	0.668	17
고추나무 ( <i>Staphylea bumalda</i> )	열매	0.695	14
고추나무 ( <i>Staphylea bumalda</i> )	과피	0.594	26
고추냉이 ( <i>Wasabia koreana</i> )	뿌리	0.671	17
광나무 ( <i>Ligustrum japonicum</i> )	잎	0.758	6
광나무 ( <i>Ligustrum japonicum</i> )	소지	0.619	23
구실잣밤나무 ( <i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i> )	잎	0.564	30
구실잣밤나무 ( <i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i> )	줄기-심재	0.530	34
구실잣밤나무 ( <i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i> )	줄기-수피	0.708	12
굴거리 ( <i>Dephniophyllum macropodum</i> )	잎	0.602	25
굴거리 ( <i>Dephniophyllum macropodum</i> )	줄기	0.619	23
굴거리 ( <i>Dephniophyllum macropodum</i> )	열매	0.692	14
굴거리 ( <i>Dephniophyllum macropodum</i> )	잎	0.445	45
굴거리 ( <i>Dephniophyllum macropodum</i> )	소지	0.380	53
까마귀밥나무 ( <i>Ribes fasciculatum</i> var. <i>chinense</i> )	열매	0.356	56
까마귀밥나무 ( <i>Ribes fasciculatum</i> var. <i>chinense</i> )	줄기	0.428	47
까마귀쪽나무 ( <i>Litsea japonica</i> )	잎	0.642	21
까마귀쪽나무 ( <i>Litsea japonica</i> )	줄기-심재	0.499	38
까마귀쪽나무 ( <i>Litsea japonica</i> )	줄기-수피	0.573	29
꽃개오동 ( <i>Catalpa bignonioides</i> )	열매	0.409	49
넓은잎취오줌풀 ( <i>Valeriana officinallis</i> var. <i>latifolia</i> )	잎	0.371	54
넓은잎취오줌풀 ( <i>Valeriana officinallis</i> var. <i>latifolia</i> )	줄기, 뿌리	0.364	55
노랑하늘타리 ( <i>Trichosanthes kinilowii</i> var. <i>japonica</i> )	종자	0.379	53
노랑하늘타리 ( <i>Trichosanthes kinilowii</i> var. <i>japonica</i> )	과육	0.409	49
녹나무 ( <i>Cinnamomum camphora</i> )	줄기-심재	0.484	40
녹나무 ( <i>Cinnamomum camphora</i> )	줄기-수피	0.620	23
누리장나무 ( <i>Clerodendrum trichotomum</i> )	잎	0.481	40
누리장나무 ( <i>Clerodendrum trichotomum</i> )	줄기	0.635	21
담배풀 ( <i>Carpesium abrotanoides</i> )	잎	0.644	20
담배풀 ( <i>Carpesium abrotanoides</i> )	줄기	0.749	7
담배풀 ( <i>Carpesium abrotanoides</i> )	뿌리	0.765	5
담팔수 ( <i>Elaeocarpus sylvestris</i> var. <i>ellipticus</i> )	잎	0.657	19
맹맹이덩굴 ( <i>Cocculus trilobus</i> )	잎	0.639	21
맹맹이덩굴 ( <i>Cocculus trilobus</i> )	열매	0.628	22
덜꿩나무 ( <i>Viburnum erosum</i> )	열매	0.668	17
독활 ( <i>Aralia continentalis</i> )			

<61>       이상과 같이 녹색배양세포는 합성하거나 천연에서 분리한 순수화합물 뿐 아니라 식물추출물의 활성도 조사할 수 있음이 확인되었다. 따라서 본 발명에서 개발한 녹색배양세포를 이용한 HTS 시스템은 천연물을 대상으로 식물생장조절물질을 스크리닝하거나 활성물질을 분리하는 정제과정에 이용될 수 있는 검정법으로 유용하게 활용이 기대된다.

<62> <실시예 6> 미생물 배양액의 효능평가

<63>       토양에서 분리한 100종의 방선균(*Actinomycetes* spp.) 배양액을 대상으로 실시예 1의 배양방법과 실시예 2의 효능평가법에 따라 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*)과 다양한 잡초를 이용한 포트 테스트(pot test)의 결과와 비교하였다. 여기서 배양액은 배양액 자체를 121℃에서 5시간 멸균(autoclave)하여 최종농도 1 ppm으로 처리한 것과 에칠아세테이트(ethyl acetate, EtOAc) 추출물 10 ppm을 처리한 2 가지로 조제하여 사용하였다. EtOAc 추출물은 배양액 1 ml과 EtOAc 1 ml을 혼합하고 잘 교반한 후 원심분리하여, 하층(물층)을 제거하고 얻어진 EtOAc 층을 농축하여 사용하였다.

<64>       온실에서 실시한 포트 실험의 식물은 어저귀(

*Abutilon avicennae* Velvetleaf), 자귀풀(*Aeschynomene indica*), 개밀(), 메꽃(*Calystegia japonica*), 바랭이(*Digitaria sanguinalis*), 돌피(), 물달개비(*Monochoria vaginalis*), 벼(*Oryzae sativa*), 미국개기장(*Panicum dichotomiflorum*), 올미(*Sagittaria pygmaea*), 올챙이고랭이(), 까마중(*Solanum nigrum*), 수수(*Sorghum bicolor*), 토끼풀(), 도꼬마리(*Xanthium strumarium*)을 시험용 포트(350 cm<sup>2</sup>)에 파종하여 상법에 따라 재배하여 사용하였다. 시료추출물(0.1%의 Tween 20 용액)을 손분무기(hand sprayer)로 경엽에 처리한 후 온실에서 2주일 간 생육시키면서 처리 14일 후에 나타나는 제초활성 효능을 형태학적, 생리학적 관찰근거에 의해 육안으로 조사하여 활성을 6등급으로 분류하였다. 즉, 0은 10% 이하의 저해활성, 1은 20-30%의 저해활성, 3은 40-50%의 저해활성, 3은 60-70%의 저해활성, 4는 80-90%의 저해활성, 5는 100%의 완전저해활성을 나타내었다. 최소 1개 초종에 대한 제초활성을 근거로 정하였다.

<65>      멸균배양액 1 ppm의 경우, 2종의 균주(M531과 M774)에서 91%의 저해활성을 나타내었으며, 30% 이상 저해활성을 나타낸 균주는 모두 14종이었다(표 5). EtOAc 추출물 10 ppm의 경우는 9종의 균주(G715, G747, G774, G793, M690, M715, M755, M774)가 90% 이상 저해활성을 나타내었으며, 31종의 균주에서 30% 이상 저해활성을 나타내었다. 홍미류 계도 M715, M912, G745, M755, M281 등 32개 균주가 1 ppm 멸균배양액에서 세포생장을 촉진하여, 이들 균주는 식물생장촉진효과가 있는 유용 미생물로 기대된다. 우산이끼 녹색배양세포에 대한 활성은 좁개구리밥과 식물체에 대한 포트 테스트 결과와 높은 상관성을 나타내었다. 즉 포트 테스트에 활성을 보인 시료는 우산이끼 녹색배양세포에서 멸균배양액(1 ppm) 또는 EtOAc 추출물(10 ppm) 어느 쪽에서 활성을 나타내었음을 알 수

있다. 42종의 미생물 균주에서는 우산이끼 녹색배양세포, 좁개구리밥, 식물체 어느 쪽에도 활성을 나타내지 않았다. 따라서 본 발명에서 개발한 녹색배양세포를 이용한 HTS 시스템은 순수화합물, 식물추출물 뿐 아니라 미생물 배양액과 배양추출물에도 적용이 가능한 매우 유용한 방법임이 확인되었다.

&lt;66&gt; 【표 5】

100종의 토양 방선균 배양액 (평균배양액, 에칠아세테이트 추출물)의 우산이끼 녹색배양세포 등에 대한 활성, 42종의 균주는 우산이끼 녹색배양세포, 좁개구리밥 및 포트 테스트에 활성을 나타내지 않았음.

균주	우산이끼 배양세포*		좁개구리	포트	균주	우산이끼 배양세포*		좁개구리	포트
	평균배양액 (1 ppm)	EtOAc추출 물(10 ppm)	밥(31 ppm)	테스트		평균배양액 (1 ppm)	EtOAc추출 물(10 ppm)	밥(31 ppm)	테스트
G247	-28	18	0	0	M252	-50	77	4	0
G280	45	85	0	0	M253	7	-34	4	0
G285	32	63	5	5	M261	32	46	0	0
G297	-47	2	0	0	M281	-133	93	0	0
G325	-5	-12	3	0	M360	-68	53	0	0
G326	-31	-9	0	0	M366	-22	30	0	0
G360	-13	33	0	0	M407	-45	9	0	0
G370	0	0	1	0	M413	21	15	3	0
G373	13	35	3	0	M443	-101	-2	1	0
G408	-2	24	0	3	M447	-31	14	3	5
G410	23	51	2	0	M453	-39	36	2	0
G411	-17	57	0	0	M531	91	76	0	0
G450	-42	40	0	4	M537	39	58	0	5
G451	-35	2	0	4	M533	9	2	0	0
G542	24	-30	0	0	M621	22	14	0	0
G615	-11	46	0	5	M635	38	-13	4	0
G652	32	55	0	0	M656	-11	49	0	5
G669	40	-17	5	0	M690	-9	94	4	5
G715	45	96	5	3	M702	4	-12	0	0
G719	-181	-4	3	0	M705	50	52	4	4
G745	-148	-14	4	0	M715	-184	97	5	5
G747	47	99	0	4	M745	-129	-84	4	0
G765	-7	-8	4	0	M752	8	14	0	3
G774	-49	92	4	0	M755	-146	96	0	5
G793	-13	90	0	0	M774	91	99	4	5
G860	-35	2	4	0	M787	-65	32	0	0
G883	49	-3	4	0	M912	-148	-12	4	0
G1160	25	47	4	0	M938	-81	92	5	0
G1175	21	30	4	0	M1370	61	42	0	5

<67> \*우산이끼의 %활성 =  $[1 - (\text{화합물처리의 OD} / \text{대조구의 OD})] \times 100$  이며,

<68> + 값은 세포생장 저해활성을, - 값은 세포생장 촉진활성을 나타냄.

#### 【발명의 효과】

<69> 상기에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명은 엽록체가 분화된 식물배양세포를 마이크로 웰 플레이트에서 합성화합물, 천연화합물 또는 천연추출물 등과 함께 일정기간 배양한 후, 시약 등을 첨가하여 배양세포의 생장을 고효율 스크리닝 판독기 등으로 측정함으로써 매우 적은 시료 양으로 많은 수의 시료를 간편하면서 신속하게 효율적으로 생체내 활성을 반영하는 약제의 효능을 평가하는 시스템이다. 따라서 본 발명의 녹색배양세포를 이용한 약제의 고효율 스크리닝 시스템은 어떤 종류의 합성화합물, 천연화합물, 추출물, 활성분획을 대상으로 하여 식물에 대한 성장저해 및 성장촉진 효과를 나타내는 식물생장 조절물질을 짧은 시간에 저비용으로 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

녹색배양세포에 식물생장조절물질 후보군을 첨가하고 배양한 후 세포의 생장을 동시에 대규모로 측정하는 식물생장조절물질의 고효율 스크리닝 방법.

**【청구항 2】**

제 1항에 있어서, 상기 녹색배양세포는 우산이끼 녹색배양세포 또는 담배 녹색배양세포인 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 상기 식물생장조절물질 후보군은 합성화합물, 천연물을 포함한 순수화합물, 식물추출물 및 미생물 배양액을 포함하는 추출물 또는 분획으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**【청구항 4】**

제 1항에 있어서, 상기 배양은 마이크로웰 플레이트에서 배양하는 특징으로 하는 방법.

## 【청구항 5】

제 1항에 있어서, 세포의 성장을 측정하는 것은 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드(2,3,5-triphenyltetrazolium chlorolide)를 첨가한 후 OD 값을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 방법은

- 1) 마이크로웰 플레이트에 녹색배양세포 및 식물생장조절물질 후보군을 첨가하여 배양하는 단계;
- 2) 상기 배양 후에 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드로 처리하는 단계;
- 3) 상기 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드 처리한 후 마이크로웰 내의 용액을 제거하는 단계;
- 4) 상기 마이크로웰에 에탄올을 첨가하여 반응시키는 단계;
- 5) 상기 반응용액을 새로운 마이크로웰 플레이트에 옮기는 단계; 및
- 6) 상기 마이크로웰 플레이트를 고효율 스크리닝 판독기를 이용하여 OD 값을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

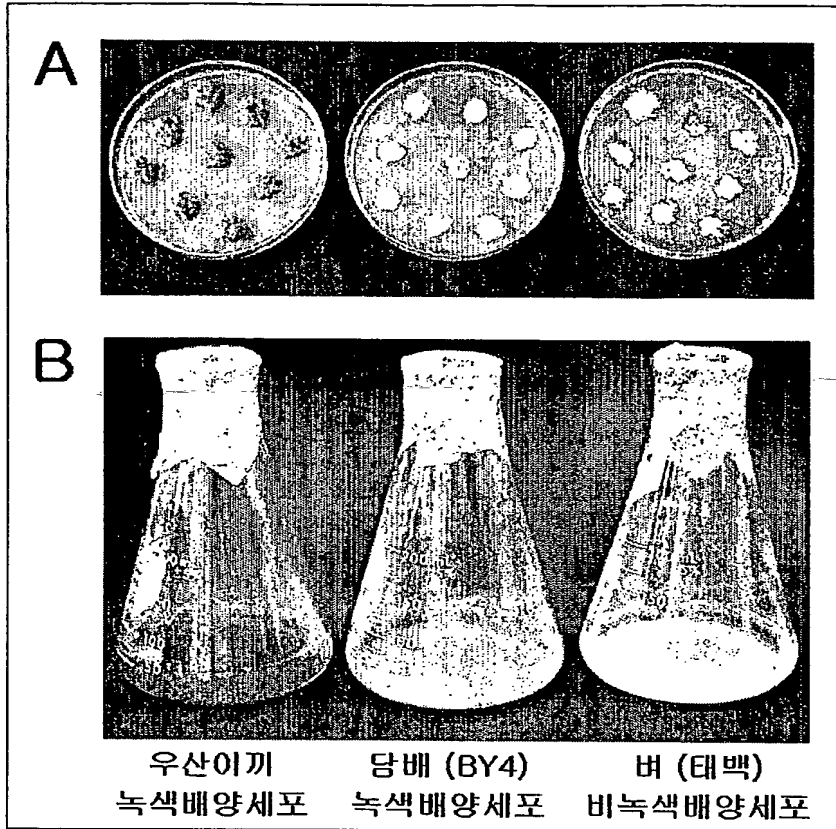
## 【청구항 7】

제 6항에 있어서, 상기 단계 3은 2,3,5-트리페닐테트라졸리움 클로로라이드 처리한 후 4.5 내지 5.5 시간 후에 마이크로웰 내의 용액을 제거하고, 상기 단계 4는 95% 에탄올을 첨가하여 60℃에서 1 시간 반응시키는 것을 특징으로 하는 방법.



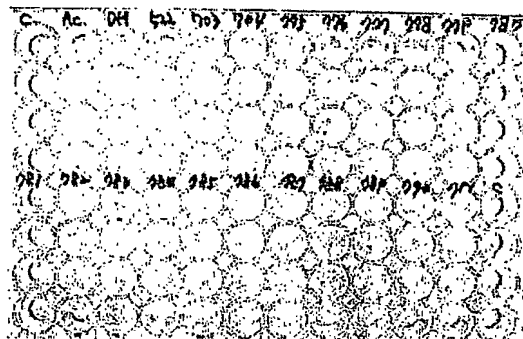
【도면】

【도 1】

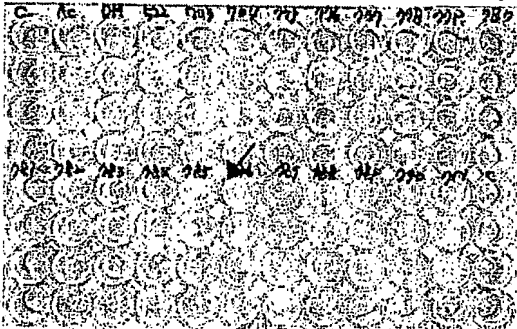


## 【도 2】

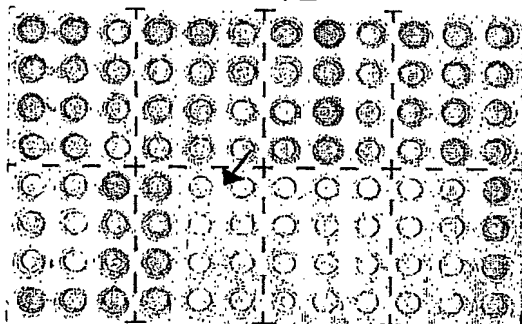
## A. 약제처리 전



## B. 약제처리 후 7일째 (TTC 처리 전)

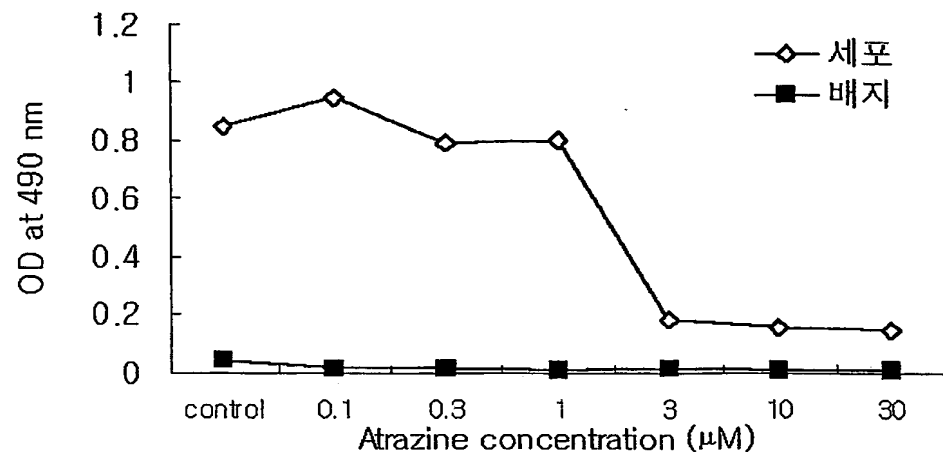


## C. TTC 처리 후 5시간

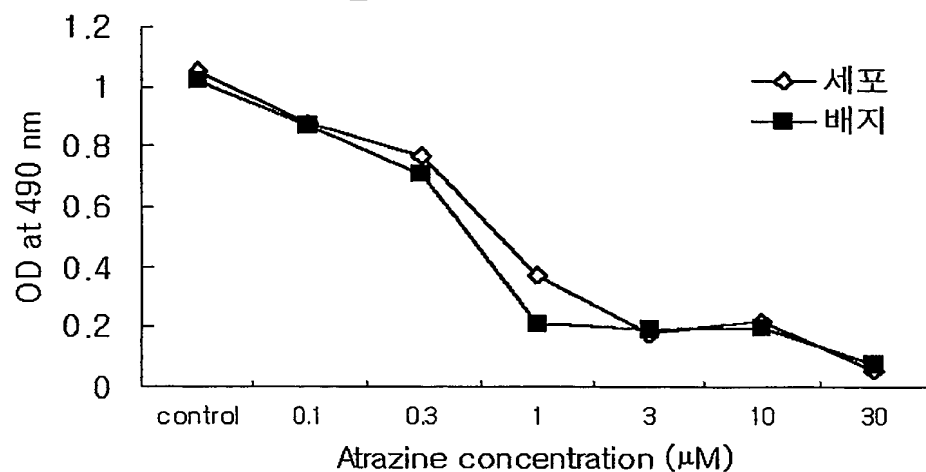


## 【도 3】

## A. TTC 처리 후 1시간



## B. TTC 처리 후 5시간



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**